

層へのテトラデカンの移行はなく、破過はなかった。また、同時に採気した3本の捕集管の測定値は、各濃度とも10%以内であり、安定した結果が得られた。

D. 考察

パラジクロロベンゼン、テトラデカンとも、室内濃度指針値である40ppbを考慮し、40、120及び400 ppbを目標暴露濃度として吸入暴露方法の開発を行った結果について、以下に考察する。

D-1 パラジクロロベンゼン

パラジクロロベンゼン蒸気の発生装置、パラジクロロベンゼン蒸気を希釈するための一次希釈装置、希釈したパラジクロロベンゼン蒸気の流量を制御するための供給バルブ（フローコントロールバルブ）と流量計、パラジクロロベンゼン蒸気を新鮮空気と混合し二次希釈するためのラインミキサー、動物をパラジクロロベンゼン蒸気に暴露させる全身暴露型の吸入チャンバー、濃度測定のためサンプリング装置により成る吸入暴露装置を試作した。この吸入暴露装置を使用して、①パラジクロロベンゼン蒸気の発生方法、②パラジクロロベンゼン蒸気の空気との混合及び濃度制御の方法、③吸入チャンバー内のパラジクロロベンゼンの濃度測定の方法について、検討した。

1) パラジクロロベンゼン蒸気の発生方法

パラジクロロベンゼン蒸気の発生方法は、加熱によるパラジクロロベンゼンの変性の可能性を考慮し、また、家庭環境ではパラジクロロベンゼンが昇華により

気中に拡散することから、固体の状態のパラジクロロベンゼンから昇華する蒸気を利用する方法を選択し、発生装置を作製し検討した。すなわち、恒温槽（27℃）に収納した発生容器内に固体のパラジクロロベンゼンを入れ、清浄空気を供給しパラジクロロベンゼンを気化させると共に、キャリアー空気を流す装置を作製し、試運転した。その結果、パラジクロロベンゼン蒸気を再結晶せずに発生させることが出来ることがわかった。

2) パラジクロロベンゼン蒸気の空気との混合及び濃度制御の方法

上記 1) で作製した発生装置を用いて、吸入暴露装置を構築し、パラジクロロベンゼン蒸気の空気との混合及び濃度制御の方法について検討した。すなわち、発生装置により作ったパラジクロロベンゼン蒸気を循環式恒温槽で一次希釈空気を用いて希釈混合、流量計を用いてこのパラジクロロベンゼン蒸気の一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給し、ラインミキサー上で二次希釈空気と混合、設定濃度としたパラジクロロベンゼンを吸入チャンバーに送り込む吸入装置を作製した。この装置を使して、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb で 6 時間及び 22 時間吸入暴露するための設定条件について検討した。その結果、恒温槽と一次希釈装置の温度及び発生機室の室温を 27℃、発生空気流量を 0.2 L/分、キャリアー空気流量を 5 L/分、一次希釈空気流量を 20 L/分、二次希釈空気流量を 212 L/分、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ、1.87、5.9 及び 17.7 L/分の設定条件により、実測値と目標濃度との差が各濃度

とも10%以内となった。従って、この設定条件で目標吸入暴露濃度40、120及び400ppbの暴露試験が可能であると考えられた。

この条件を用いて、目標吸入暴露濃度40、120及び400ppbで、6時間/日、7日間及び22時間/日、7日間のパラジクロロベンゼンの吸入暴露試験を行った。その結果、6時間/日、7日間試験では、目標暴露濃度40、120及び400ppbに対し、吸入チャンバー内の測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ 39 ± 2 ppb（36ppb～42ppb）、 119 ± 10 ppb（108ppb～137ppb）及び 387 ± 32 ppb（351ppb～443ppb）であった。また、22時間/日、7日間試験では、目標暴露濃度40、120及び400ppbに対し、吸入チャンバー内の測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ 40 ± 5 ppb（34ppb～47ppb）、 120 ± 13 ppb（107ppb～141ppb）及び 404 ± 50 ppb（342ppb～465ppb）であった。

3) 吸入チャンバー内のパラジクロロベンゼンの濃度測定の方法

吸入チャンバー内のパラジクロロベンゼン濃度は固相吸着-溶媒抽出法により測定した。すなわち、捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引し、捕集剤からパラジクロロベンゼンを溶媒抽出し分析した。捕集時間は、6時間、22時間捕集とも破過が起きないことから暴露開始から終了までの全時間とするのが適切と考えられた。また、同時に測定した捕集管の間の測定値のばらつきは10%以内であり、安定した測定結果が得られることが分かった。吸入チャンバー内のパラジクロロベンゼン濃度は、最低濃度である40ppb群でもppb単位の測定が可能であり、今回

の方法は吸入チャンバーのパラジクロロベンゼン濃度の把握に有効であった。

以上のように、パラジクロロベンゼンを被験物質とし、室内濃度指針値である40ppbを考慮した40、120及び400ppbを目標暴露濃度として暴露技術の開発を行ない、その実用性について検証した。その結果、固体の状態のパラジクロロベンゼンから昇華する蒸気を利用する方法が極低濃度暴露実験に利用できることを確認できた。

D-2 テトラデカン

1) テトラデカン蒸気の発生方法

被験物質供給装置の発生容器内のテトラデカンを循環式恒温槽で加熱（24℃）しながら、清浄空気のバブリングにより蒸発させ、このキシレン蒸気を含む空気を循環式恒温槽で一定温度（18℃）に冷却後、循環式恒温槽で一定温度に再加熱（25℃）する方法により、テトラデカン蒸気を得ることができた。

2) テトラデカン蒸気の空気との混合及び濃度制御の方法

上記1)で作製した発生装置を用いて、吸入暴露装置を構築して、テトラデカン蒸気の空気との混合及び濃度制御の方法について検討した。すなわち、発生装置により作ったテトラデカン蒸気を流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給、新鮮空気と混合し設定濃度としたテトラデカンを吸入チャンバーに送り込む吸入装置を作製した。この装置を使用し、目標吸入暴露濃度40、120及び400ppbで6時間及び22時間吸入暴露するための設定条件について検討した。その結果、発生

容器の温度を 24°C、冷却温度を 18°C、再加熱の温度を 25°C、発生空気流量とキャリアー空気流量の比 3:1、希釈空気流量を 212 L/分、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb のフローメータの流量を、それぞれ、1.75、6.2 及び 29.1 L/分の設定条件により、実測値と目標濃度との差が各濃度とも 10%以内となった。従って、この設定条件で目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb の暴露試験が可能であると考えられた。

この条件を用いて、目標吸入暴露濃度 40、120 及び 400 ppb で、6 時間/日、7 日間及び 22 時間/日、7 日間のテトラデカンの吸入暴露試験を行った。その結果、6 時間/日、7 日間試験では、目標暴露濃度 40、120 及び 400 ppb に対し、吸入チャンバー内の測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ 39±3ppb (36 ppb～44 ppb)、123±13 ppb (107 ppb～144 ppb) 及び 422±46 ppb (386 ppb～497 ppb) であった。また、22 時間/日、7 日間試験では、目標暴露濃度 40、120 及び 400 ppb に対し、吸入チャンバー内の測定値の平均±標準偏差（最低～最高値）は、それぞれ 46±8ppb (35 ppb～53 ppb)、128±15 ppb (107 ppb～152 ppb) 及び 383±38 ppb (332 ppb～427 ppb) であった。

3) 吸入チャンバー内のテトラデカンの濃度測定の方法

吸入チャンバー内のテトラデカン濃度を固相吸着-溶媒抽出法により測定した。すなわち、捕集管に吸入チャンバー内の空気を吸引し、捕集剤からテトラデカンを溶媒抽出し分析した。捕集時間は、6時間、22時間捕集とも破過が起きないことから暴露開始から終了までの全時間とす

るのが適切と考えられた。また、同時に測定した捕集管の間の測定値のばらつきは多くが10%以内であり、ほぼ安定した測定結果が得られることが分かった。吸入チャンバー内のテトラデカン濃度は、最低濃度である40 ppb群でもppb単位の測定が可能であり、今回の方法は吸入チャンバーのテトラデカン濃度の把握に有効であると考えられた。

以上のように、テトラデカンを被験物質とし、室内濃度指針値である40ppbを考慮した40、120及び400 ppbを目標暴露濃度として暴露技術の開発を行ない、その実用性について検証した。その結果、加熱バブリング法 (24°C) がテトラデカンの極低濃度暴露実験に利用できることを確認できた。

E. 結論

化学物質を極低濃度で実験動物に経気道暴露するための技術開発を目的として、パラジクロロベンゼンとテトラデカンを対象として室内濃度指針値（両者とも40 ppb）を考慮した濃度で動物に全身暴露する方法の開発を試みた。その結果、パラジクロロベンゼンは固体を加熱・昇華させる方法、テトラデカンは加熱バブリング法により気化させる方法により40、120及び400 ppbの目標暴露濃度で吸入暴露する方法を開発することが出来た。

参考文献

McLafferty FW. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed. New York: John Wiley and Sons

F. 研究発表

1. 論文発表

Kasai, T., Kano, H., Umeda, Y., Sasaki, T., Ikawa, N., Nishizawa, T., Nagano, K., Arito, H., Nagashima, H., Fukushima, S. Two-year inhalation study of carcinogenicity and chronic toxicity of 1,4-dioxane in male rats. *Inhalation Toxicology*. (in press).

Take, M., Ohnishi, M., Nagano, K., Yamamoto, S., Fukushima, S. Design and performance of a system for blood collection of rats under whole-body inhalation exposure. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 34, 221-226, 2009

Ohbayashi, H., Umeda, Y., Senoh, H., Kasai, T., Kano, H., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S. Enhanced hepatocarcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to *N,N*-dimethylformamide in male rats. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 34, 53-63, 2009

Kasai, T., Saito, M., Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., Ohbayashi, H., Nishizawa, T., Nagano, K., Fukushima, S. Thirteen-week inhalation toxicity of 1,4-dioxane in rats. *Inhalation Toxicology*. 20, 961-971, 2008

Ohbayashi, H., Yamazaki, K., Aiso, S., Nagano, K., Fukushima, S., Ohta, H.

Enhanced proliferative response of hepatocytes to combined inhalation and oral exposures to *N,N*-dimethylformamide in male rats. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 33, 327-338, 2008

Ohbayashi, H., Saito, Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., M., Yamazaki, K., Nagano, K., Yamamoto, S., Fukushima, S. Occurrence of two different types of glutathion s-transferase placental form positive hepatocytes after a single administration of 2,3,7,8-tetrabromo dibenzo-p-dioxin in rats. *Industrial Health*. 46, 281-288, 2008

Kano, H., Umeda, Y., Saito, M., Senoh, H., Ohbayashi, H., Aiso, S., Yamazaki, K., Nagano, K., Fukushima, S. Thirteen-week oral toxicity of 1,4-dioxane in rats and mice. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 33, 141-153, 2008

2. 学会発表

妹尾英樹, 梅田ゆみ, 片桐 卓, 相磯成敏, 長野嘉介, 福島昭治. *N,N*-Dimethylformamideの吸入曝露と飲水投与における肝臓病変の比較. 第25回日本毒性病理学会(2009年1月、浜松).

浅倉眞澄、杉山淑江、長野嘉介、松岡厚子、福島昭治、ナノ材料のin vitro

安全性評価手法の開発 -1- 二酸化チタン 第37回日本環境変異原学会 (2008年11月)

高信健司, 竹内哲也, 奥田裕計, 長野嘉介, 福島昭治. アクリル酸エステル吸入曝露によるラットの生殖機能や児の発育に及ぼす影響. 第81回日本産業衛生学会(2008年6月、札幌).

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 吸入暴露装置の設定条件とチャンバー内のパラジクロロベンゼン濃度

	設定条件 1	設定条件 2	設定条件 3	設定条件 4
暴露時間	6 時間	6 時間	6 時間	22 時間
恒温槽の温度	25℃	27℃	27℃	27℃
一次希釈装置の温度	25℃	27℃	27℃	27℃
発生機室の室温	23℃	27℃	27℃	27℃
発生空気流量	0.1 L/分	0.2 L/分	0.2 L/分	0.2 L/分
キャリアー空気流量	なし	5 L/分	5 L/分	5 L/分
一次希釈空気流量	25 L/分	20 L/分	20 L/分	20 L/分
二次希釈空気流量	212 L/分	212 L/分	212 L/分	212 L/分
フローメータの流量				
目標濃度 40 ppb	1.26 L/分	1.26 L/分	1.86 L/分	1.87 L/分
120 ppb	3.8 L/分	3.8 L/分	5.5 L/分	5.9 L/分
400 ppb	12.6 L/分	12.6 L/分	17.8 L/分	17.7L/分
測定値				
目標濃度 40 ppb	10±1 ppb (25%)	27±2ppb (68%)	40±2 ppb (99%)	38±1 ppb (96%)
120 ppb	30±0 ppb (25%)	83±1 ppb (69%)	111±3 ppb (92%)	124±4 ppb (103%)
400 ppb	104±3 ppb (26%)	283±3 ppb (71%)	404±7ppb (101%)	413±20 ppb (103%)

() : 目標濃度に対する%
網掛け : 変更した設定条件

表2 吸入暴露装置の設定条件とチャンバー内のテトラデカン濃度

	設定条件 1	設定条件 2	設定条件 3	設定条件 4	設定条件 5	設定条件 6
暴露時間	6 時間	6 時間	22 時間	22 時間	22 時間	22 時間
発生容器の温度	24℃	24℃	24℃	24℃	24℃	24℃
冷却温度	18℃	18℃	18℃	18℃	18℃	18℃
再加熱温度	25℃	25℃	25℃	25℃	25℃	25℃
発生空気+キャリアー空気流量	34 L/分	34 L/分	34 L/分	34 L/分	34 L/分	34 L/分
発生空気流量: キャリアー空気流量	3 : 1	3 : 1	3 : 1	3 : 1	3 : 1	3 : 1
希釈空気流量	212 L/分	212 L/分	212 L/分	212 L/分	212 L/分	212 L/分
フローメータの流量						
目標濃度 40 ppb	2.7 L/分	2.12 L/分	1.83 L/分	1.6 L/分	1.6 L/分	1.75 L/分
120 ppb	8.1 L/分	5.6 L/分	5.3 L/分	5.3 L/分	5.3 L/分	6.2 L/分
400 ppb	27 L/分	23.5 L/分	24.7 L/分	24.7 L/分	24.7 L/分	29.1 L/分
測定値						
目標濃度 40 ppb	51±2 ppb (128%)	46±2ppb (115%)	50±2 ppb (124%)	46±2 ppb (115%)	37±1 ppb (92%)	42±2 ppb (104%)
120 ppb	167±11ppb (139%)	127±5ppb (106%)	125±5 ppb (104%)	106±4 ppb (88%)	92±18 ppb (77%)	111±3 ppb (93%)
400 ppb	459±8 ppb (115%)	380±15ppb (95%)	440±9ppb (110%)	330±10ppb (83%)	343±23ppb (86%)	390±23ppb (98%)

() : 目標濃度に対する%
 網掛け : 変更した設定条件

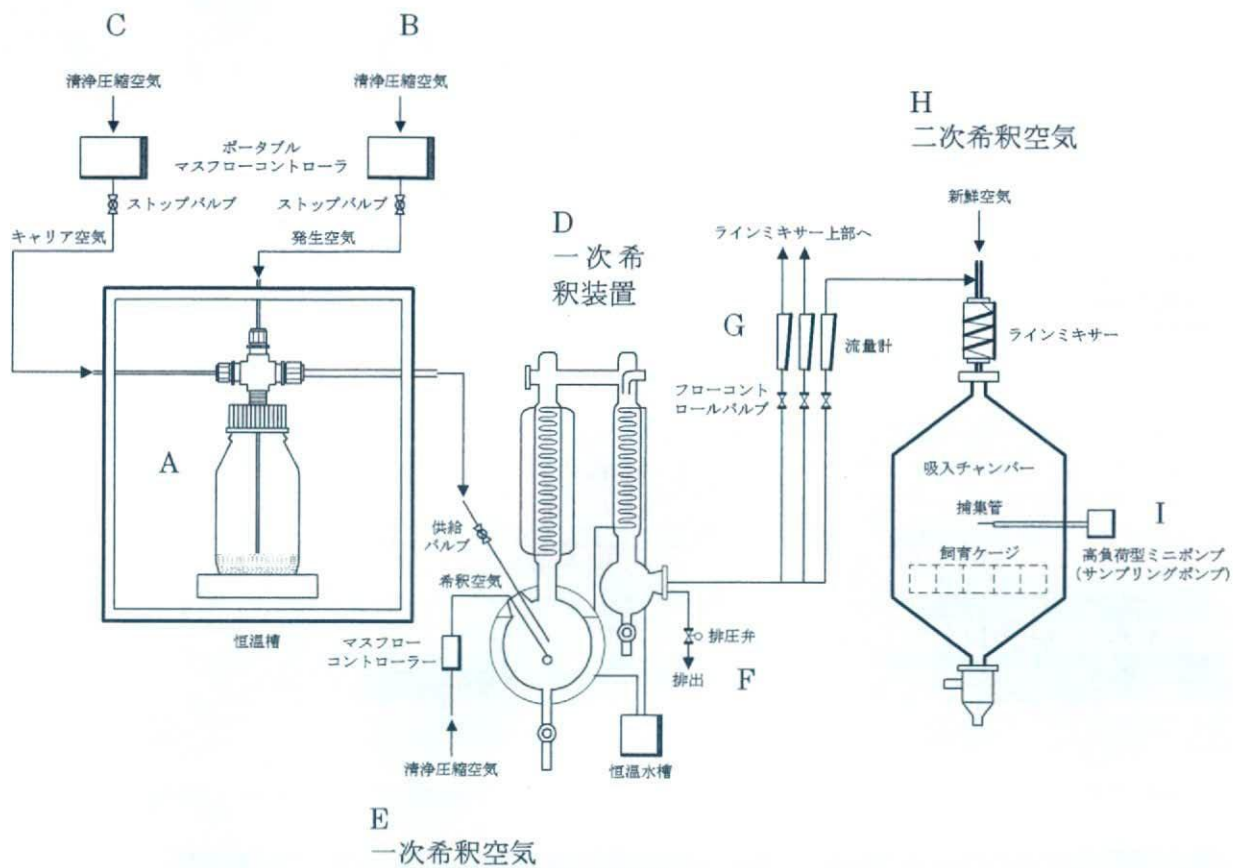


図1 吸入暴露装置のシステム (パラジクロロベンゼン)

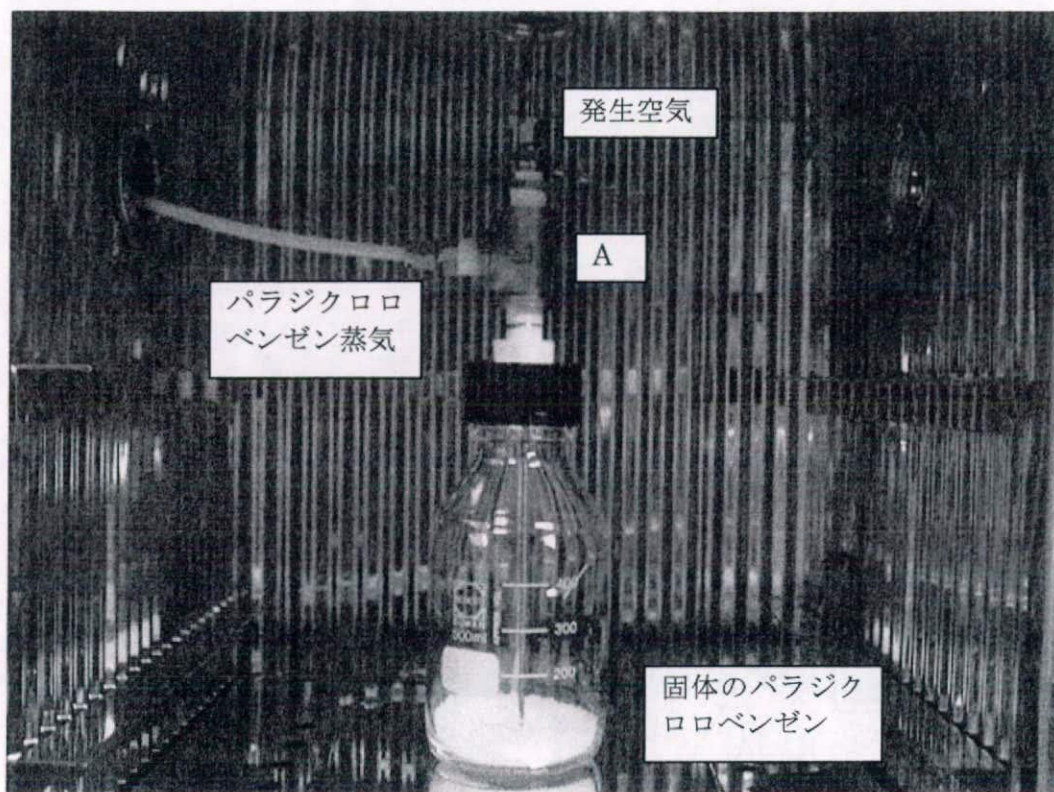


図2 パラジクロロベンゼンの発生容器 (改良前)

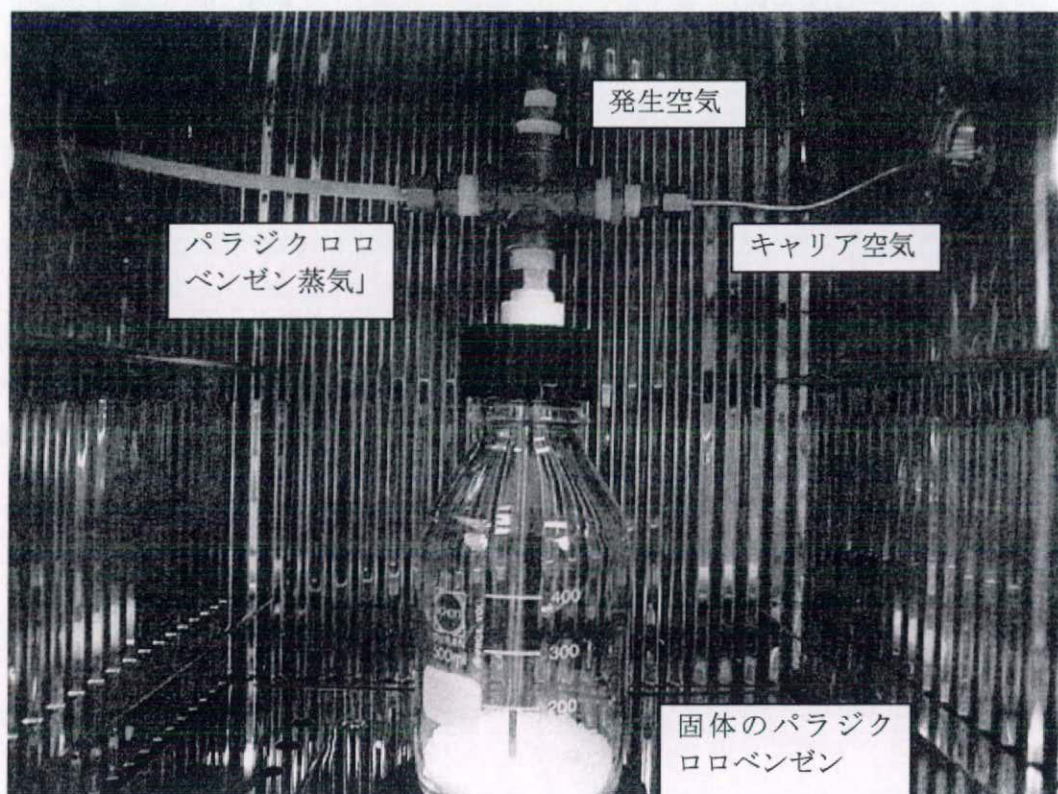


図3 パラジクロロベンゼンの発生容器 (改良後)

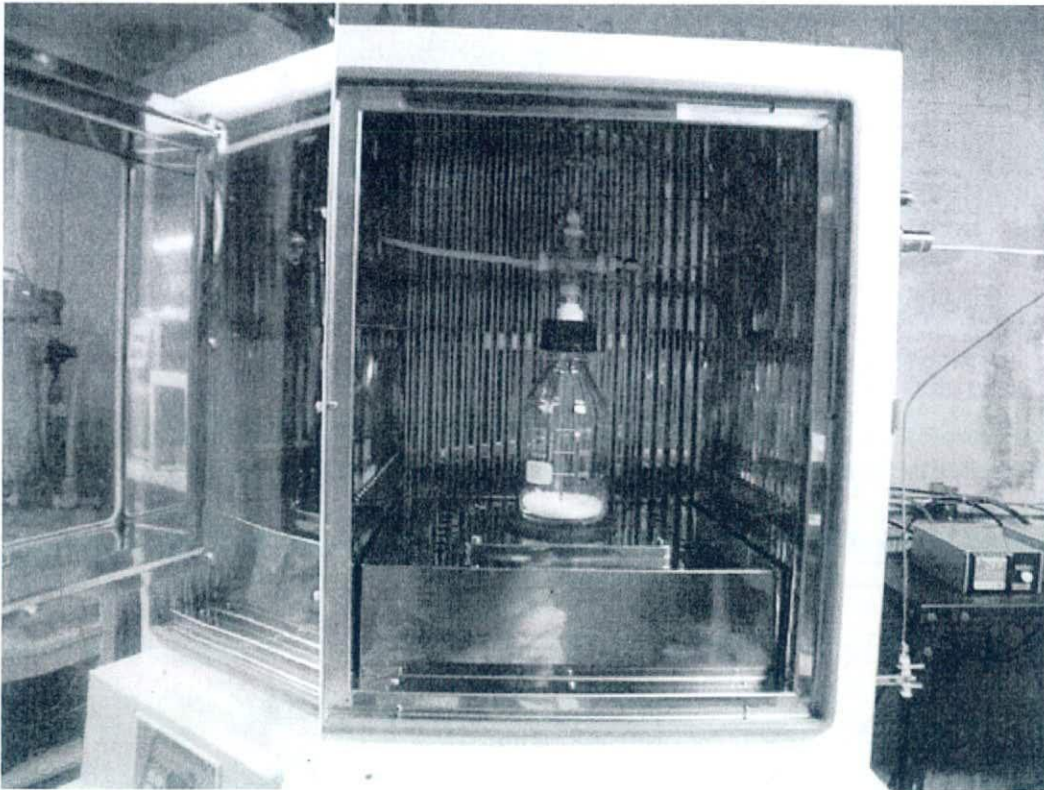


図4 恒温槽 (27℃) に収納したパラジクロロベンゼン発生容器

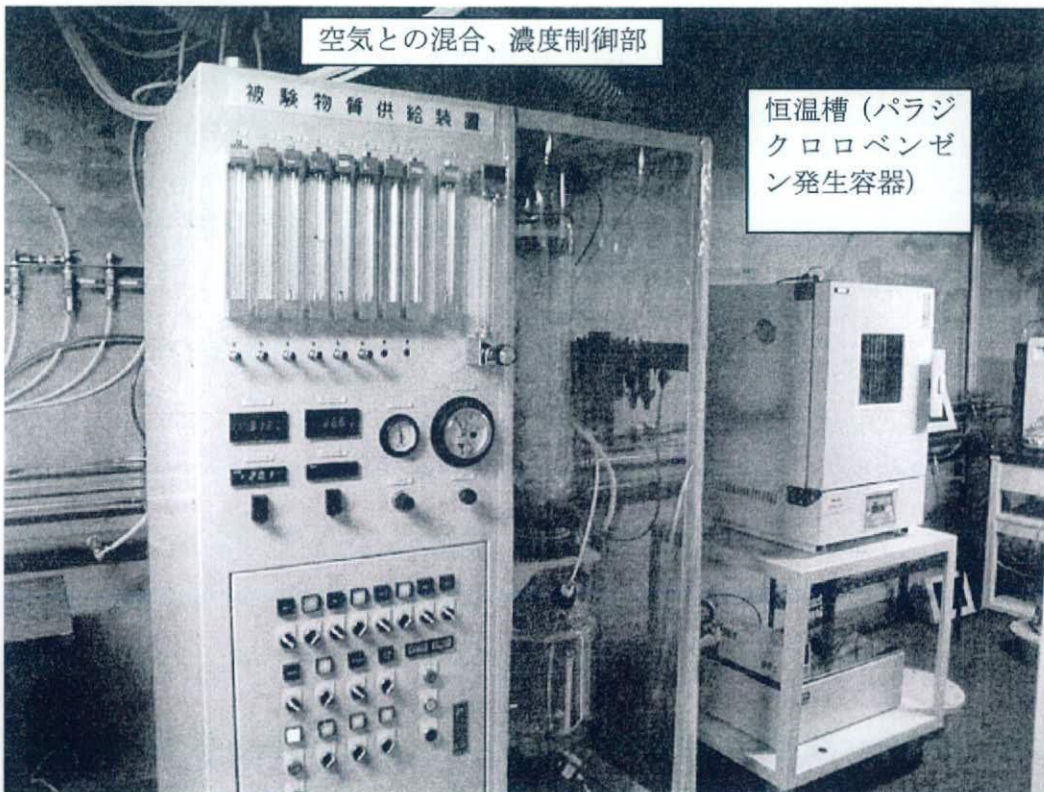


図5 恒温槽 (パラジクロロベンゼン発生容器)、空気との混合、濃度制御部の外観

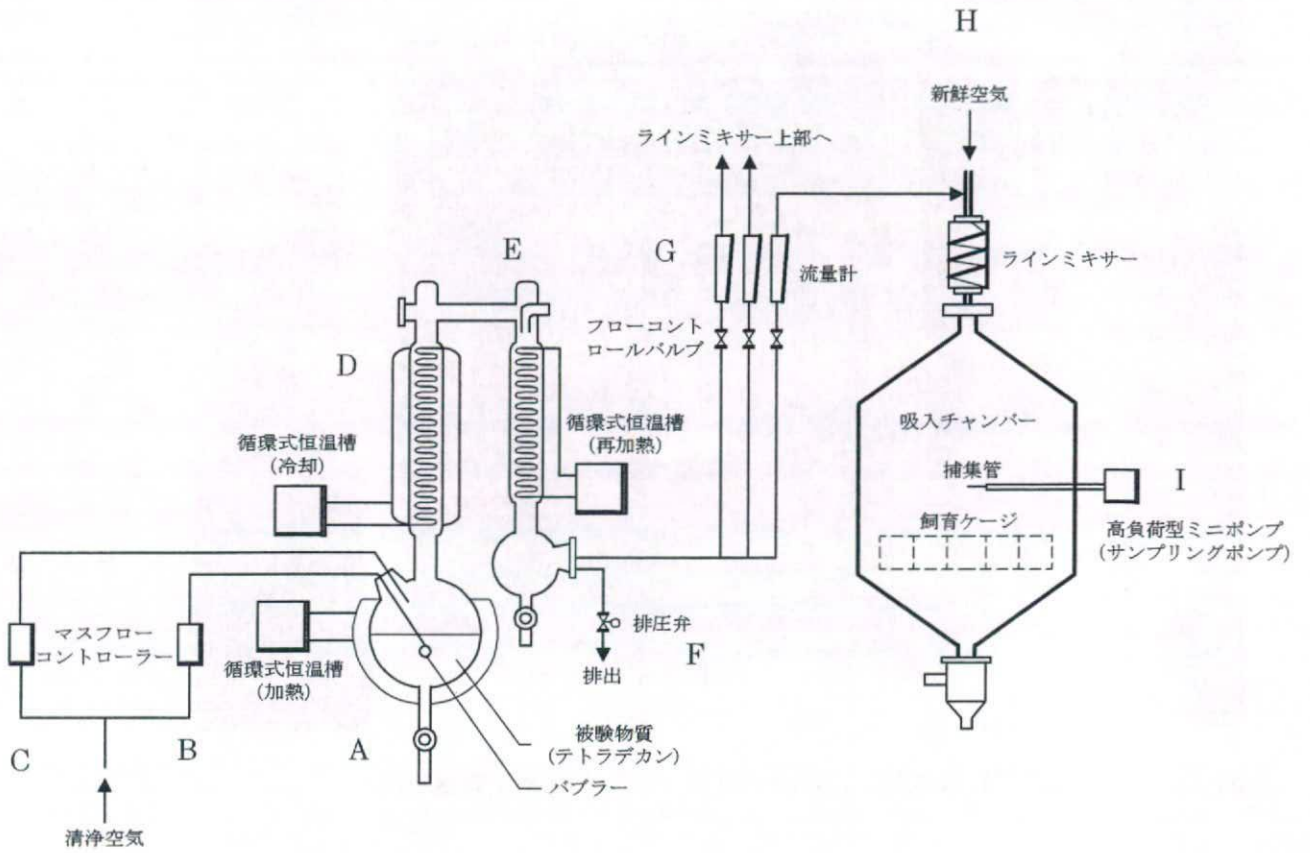


図6 吸入暴露装置のシステム (テトラデカン)

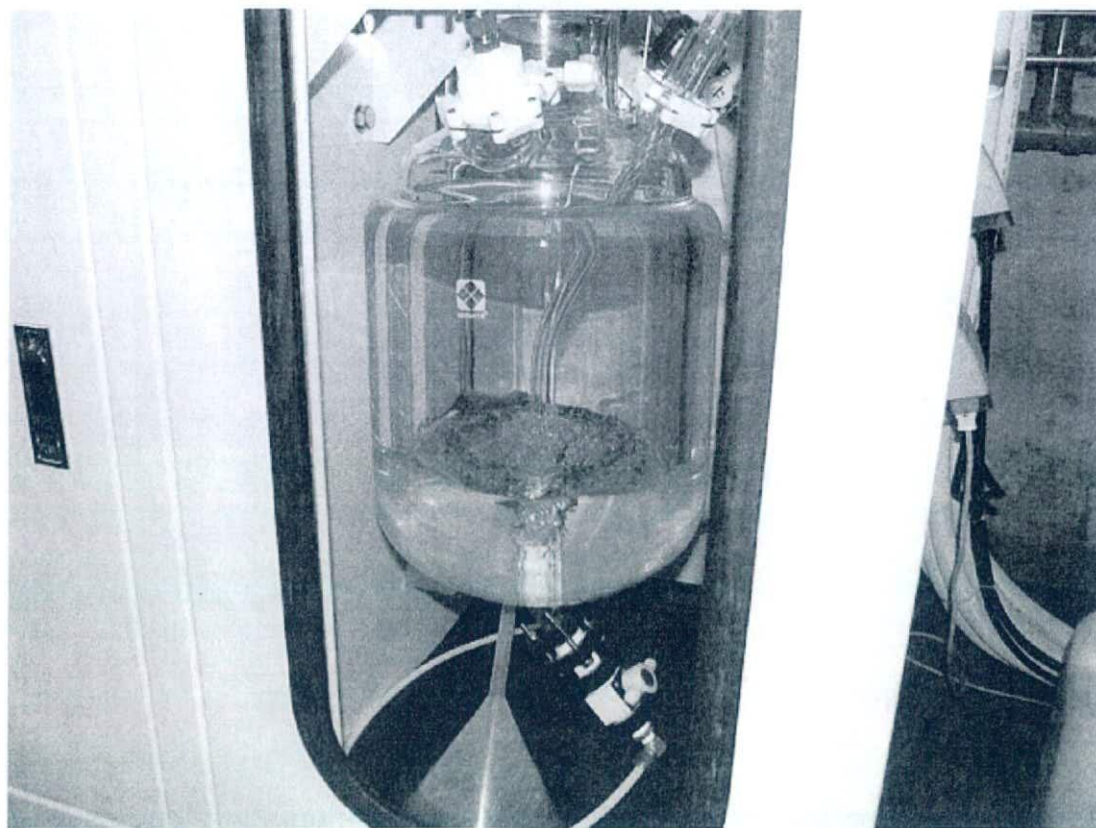


図 7 テトラデカン蒸気の発生装置

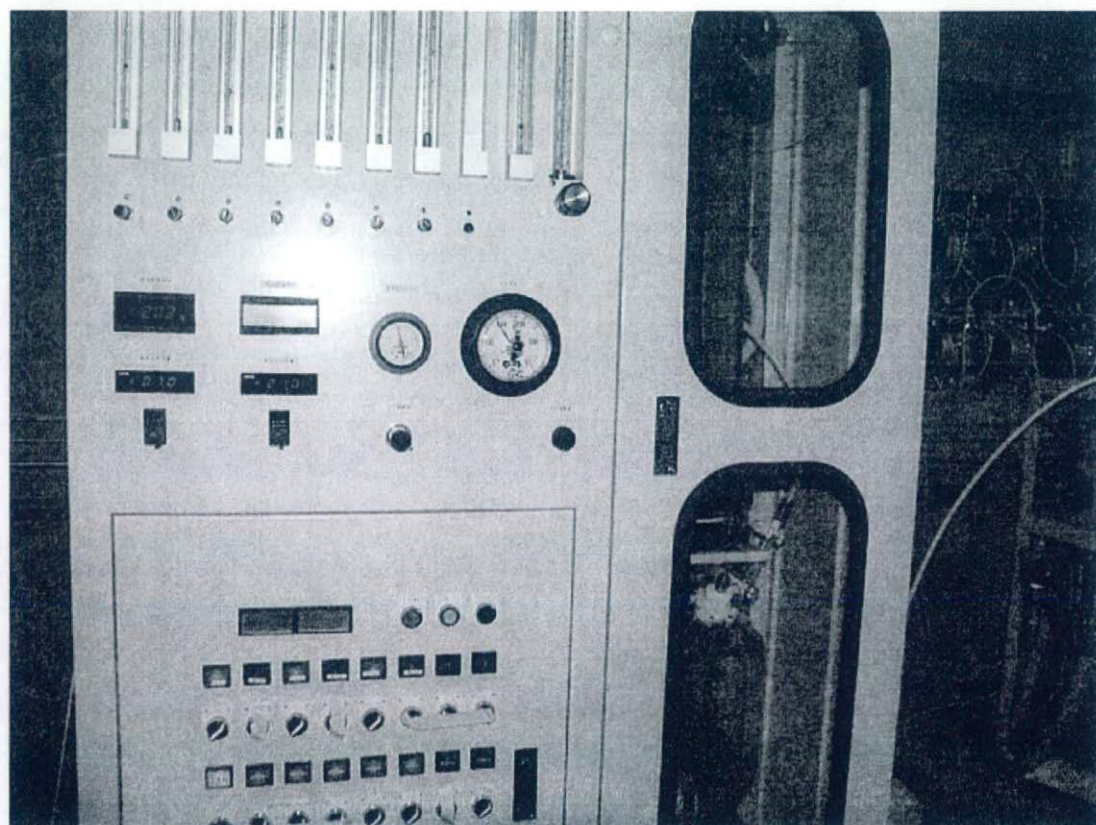


図 8 被験物質供給装置 (テトラデカン蒸気の発生装置と流量計)

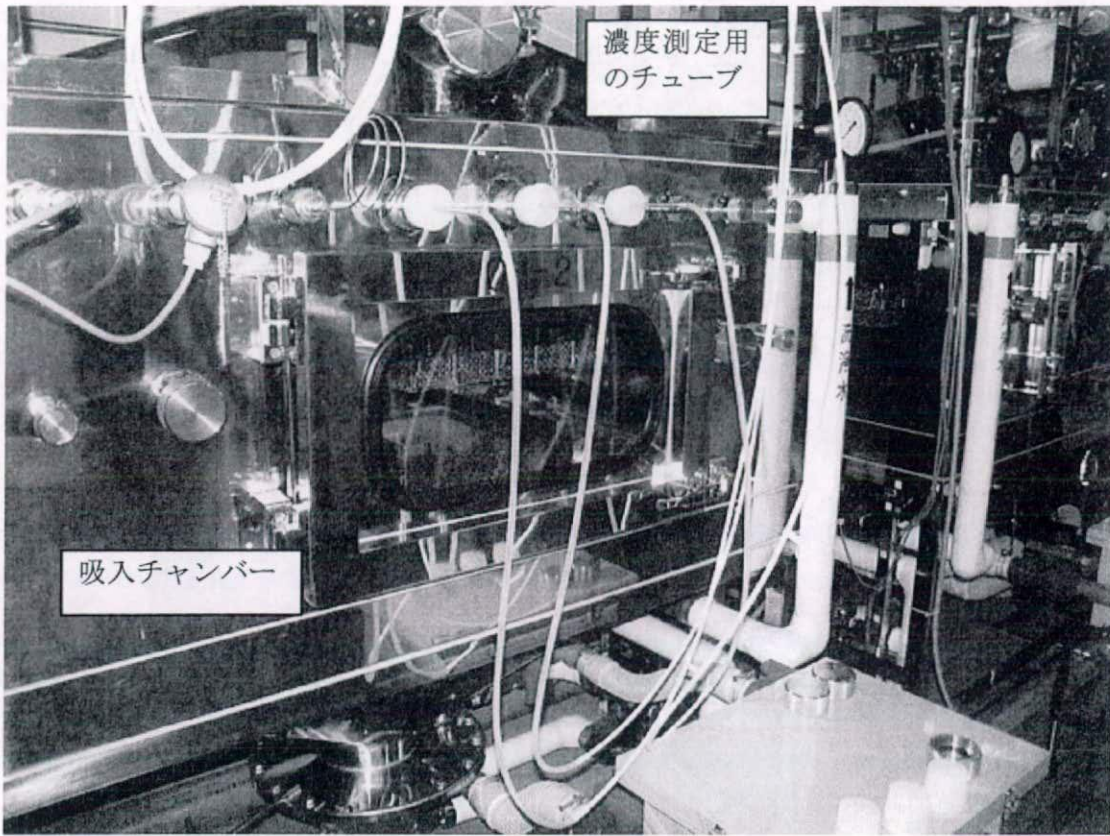


図 9 吸入チャンバー

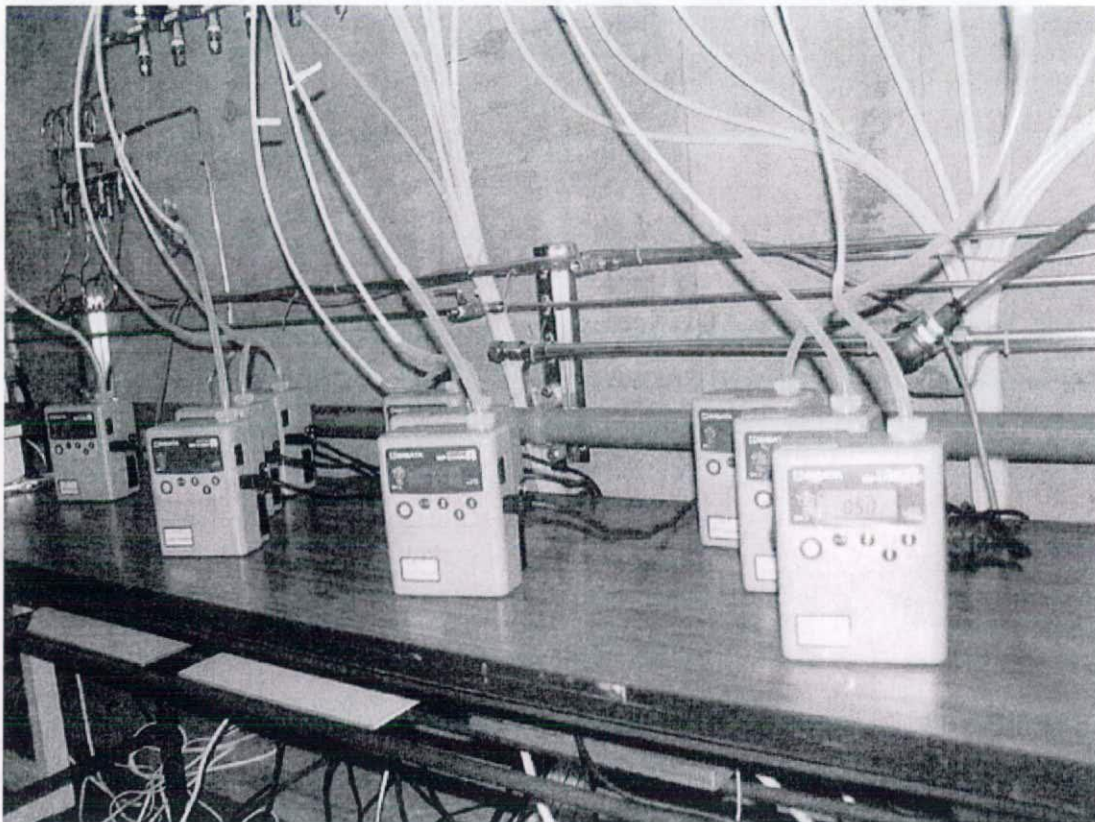


図 10 濃度測定用のサンプリングポンプ

別添 5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、種村健太郎、小川幸男、児玉幸夫、関田清司	Percellome Project、遺伝子医学MOOK10、DNAチップ/マイクロアレイ臨床応用の実際	油谷浩幸	遺伝子医学MOOK10、DNAチップ/マイクロアレイ臨床応用の実際	株式会社メディカルドウ	東京	2008	363 - 371
菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小川幸男、関田清司	トキシコゲノミクスの大規模高精度データベースの構築と解析	野村護、堀井郁夫、吉田武美	非臨床試験ーガイドラインへの対応と新しい試みー	株式会社エル・アイシー	東京	2008	561 - 568

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kasai, T., Kano, H., Umeda, Y., Sasaki, T., Ikawa, N., Nishizawa, T., Nagano, K., Arito, H., Nagashima, H., Fukushima, S.	Two-year inhalation study of carcinogenicity and chronic toxicity of 1,4-dioxane in male rats	Inhalation Toxicology			In press
Take, M., Ohnishi, M., Nagano, K., Yamamoto, S., Fukushima, S	Design and performance of a system for blood collection of rats under whole-body inhalation exposure	The Journal of Toxicologic Sciences	34	221 - 226	2009
Ohbayashi, H., Umeda, Y., Senoh, H., Kasai, T., Kano, H., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S	Enhanced hepatocarcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to N,N-dimethylformamide in male rats	The Journal of Toxicologic Sciences	34	53 - 63	2009
Kasai, T., Saito, M., Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., Ohbayashi, H., Nishizawa, T., Nagano, K., Fukushima, S	Thirteen-week inhalation toxicity of 1,4-dioxane in rats	Inhalation Toxicology	20	961 - 971	2008

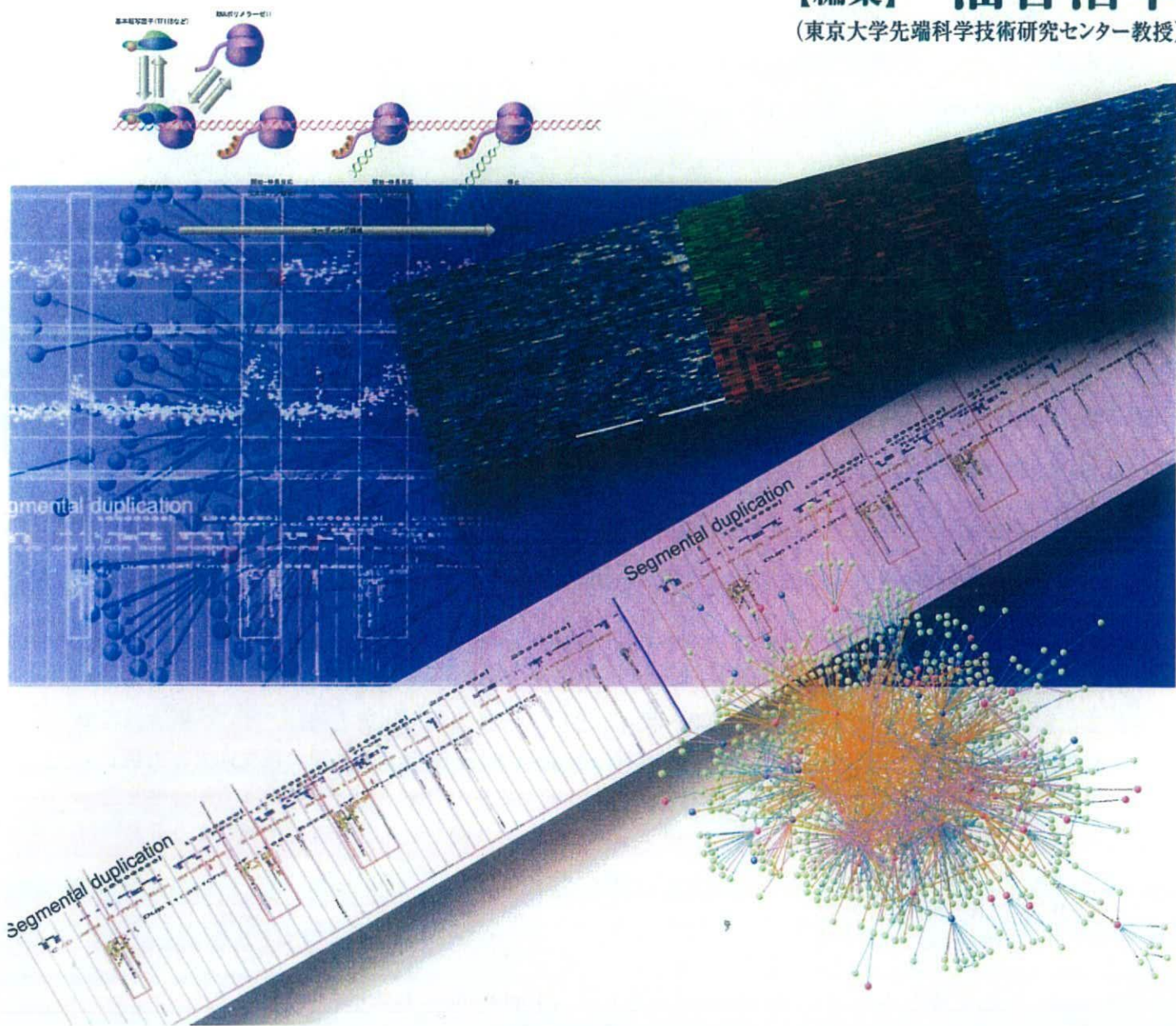
Ohbayashi, H., Yamazaki, K., Aiso, S., Nagano, K., Fukushima, S., Ohta, H	Enhanced proliferative response of hepatocytes to combined inhalation and oral exposures to N,N-dimethylformamide in male rats	The Journal of Toxicologic Sciences	33	327 - 338	2008
Ohbayashi, H., Saito, Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., M., Yamazaki, K., Nagano, K., Yamamoto, S., Fukushima, S	Occurrence of two different types of glutathion s-transferase placental form positive hepatocytes after a single administration of 2,3,7,8-tetrabromo dibenzo-p-dioxin in rats	Industrial Health	46	281 - 288	2008
Kano, H., Umeda, Y., Saito, M., Senoh, H., Ohbayashi, H., Aiso, S., Yamazaki, K., Nagano, K., Fukushima, S	Thirteen-week oral toxicity of 1,4-dioxane in rats and mice	The Journal of Toxicologic Sciences	33	141 - 153	2008
Uchida K, Nakata K, Suzuki T, Luisetti M, Watanabe M, Koch DE, Stevens CA, Beck DC, Denson LA, Carey BC, Keicho N, Krischer JP, Yamada Y, Trapnell BC	Granulocyte/macrophage -colony-stimulating factor autoantibodies and myeloid cell immune functions in healthy subjects	Blood	12 113 (11)	2547 - 2556	2009
Vollstedt S, Yuliwulandari R, Okamoto K, Lien LT, Keicho N, Rochani JT, Wikaningrum R, Tokunaga K	No evidence for association between the interferon regulatory factor 1 (IRF1) gene and clinical tuberculosis	Tuberculosis	89 (1)	71 - 76	2009
Mahasirimongkol S, Yanai H, Nishida N, Ridruechai C, Matsushita I, Ohashi J, Summanapan S, Yamada N, Moolphate S, Chuchotaworn C, Chaiprasert A, Manosuthi W, Kantipong P, Kanitwittaya S, Sura T, Khusmith S, Tokunaga K, Sawanpanyalert P, Keicho N	Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais	Genes Immun	10 (1)	77 - 83	2009
Nishiyama A, Wakasugi N, Kirikae T, Quy T, Ha le D, Ban VV, Long HT, Keicho N, Sasazuki T, Kuratsuji T	Risk factors for SARS infection within hospitals in Hanoi, Vietnam	Jpn J Infect Dis	61 (5)	388 - 390	2008

DNAチップ/マイクロアレイ 臨床応用の実際

基礎、最新技術、臨床・創薬研究応用への実際から
今後の展開・問題点まで

【編集】 油谷浩幸

(東京大学先端科学技術研究センター教授)



2. トキシコゲノミクス

1) Percellome Project

菅野 純・北嶋 聡・相崎健一・五十嵐勝秀・中津則之
高木篤也・種村健太郎・小川幸男・児玉幸夫・関田清司

毒性学（トキシコロジー）は身の回りの物質の毒性（有毒性）を予測し、それらの曝露による被害を未然に防ぐ研究分野である。その精度向上を目的にトキシコゲノミクス研究を開始した。マイクロアレイから細胞1個あたりのmRNAコピー数を得るPercellome法を開発し、遺伝子発現変動を投与量および時間の関数として三次元曲面（surface）データとして可視化し、これを基本に網羅的解析法を独自に開発した。単回投与による肝の初期反応データを中心に延べ約2億超データを採取し、毒性カスケード解明の糸口となる変動遺伝子情報を蓄積しつつある。

はじめに

毒性学（トキシコロジー）は人の健康・安全を確保することを目的とし、外来性の物質（化学物質など）が生体に入射した際の生体反応を記述し理解することにより、身の回りの物質の毒性（有害性）を予測し、それらの曝露による被害を未然に防ぐとともに、曝露された場合の治療法を開発する研究分野である。この有害性予測の精度向上をめざした分子生物学レベルでの毒性研究は、遺伝子、遺伝子発現、タンパク合成、タンパク修飾などのあらゆる段階を対象とする。その際、探索的な科学研究と異なる点として、毒性学には「予期せぬ事態」を見逃がさない網羅性の確保が要求されることが挙げられる。われわれはその第一段階として、遺伝子発現をほぼ全遺伝子についてカバーする高密度cDNAマイクロアレイによる毒性的トランスクリプトーム研究、すなわちトキシ

コゲノミクス研究を開始した。

I. トキシコゲノミクス研究の目的と最終目標

従来の毒性学は、生物個体が「ブラックボックス」であっても、それに対する「入力」としての化学物質が引き起こす毒性症状をそれからの「出力」として記述し、入出力の関連を体系化することで安全性確保に貢献してきた。われわれのトキシコゲノミクス研究は、ブラックボックスの中身を遺伝子発現カスケードの面から解明することにより生体反応メカニズムに基づいた分子毒性学を構築することを目的としている。そして、究極の目標としてコンピュータ内のバーチャルマウスやバーチャル人間の完成を掲げ、そこへ向う過程で実験動物からヒトへの外挿の精度向上を実現しようとするものである。上述のごとく網羅性を重んじるため、得たデータを既知情報により分類・解

key words

トキシコゲノミクス、分子毒性学、遺伝子発現カスケード、標準化、Percellome法、三次元多層（Millefeuille surface）データ

析するアプローチ（いわゆる phenotypic anchoring）は最後に回し、トランスクリプトーム情報そのものの中から、生物学的に有意な反応カスケードを「教師なしクラスタリング手法（unsupervised clustering）」などを駆使して抽出するアプローチをとることとした。これはちょうど、電子顕微鏡写真が世に現れた時の状況になぞらえることができる。すなわち、光学顕微鏡では見えない「もの」が新たに見えるようになったわけであるが、それが何であるかは光学顕微鏡像を参照しても簡単にはわからない。電子顕微鏡像を解釈しコンセンサスとしての教科書（図譜など）ができあがって初めて日常的に利用されるようになったわけであり、教科書を完成する作業自体が1つの研究分野をなしたという歴史がある。繰り返しになるが、われわれのめざすトキシコゲノミクスと従来の毒性学との関係は電子顕微鏡と光学顕微鏡の関係にあり、実用化に向けての教科書作成にあたる基礎研究が必要である。

話は前後するが、毒性学研究は、人体実験が可能な一部の状況（成人を対象とした医薬品の臨床試験など）を除いて、ヒトの身代わりとしての実験動物を用いて行われる。上記の目標を達成するために、われわれは動物種としてマウスを選択したが、その理由は、遺伝子情報がヒトに次いで豊富であること、および遺伝子改変マウスが利用可能であり、それから得られる情報（下流カスケードの情報、ノックアウトマウスが示す欠落症状など）が客観的な遺伝子発現カスケードの描出と毒性学的意義づけに大きく貢献することが予見されたことによる。それでも、複数の実験から得られる大量の実験データを蓄積したうえで横断的な解析が必須となる。そのためには、データの標準化と互換性確保が重要となってくる。そこでわれわれは、マイクロアレイや定量PCRから細胞1個あたりの mRNA コピー数を得る Percellome 法を開発した。

II. Percellome 法：細胞1個あたりの mRNA コピー数として発現値を得る方法

原理は、サンプルの細胞数に対して標準化する

という単純なものである。具体的には、サンプル破碎液の DNA 量から細胞数を求め、外部標準 mRNA（スパイク RNA）を細胞1個あたり決まった分子数だけその破碎液に添加し、そして RNA 抽出、測定に移る。スパイク RNA の発現値が細胞1個あたり何コピーに由来するかが既知であることを利用し、サンプル中のすべての RNA 測定値を、細胞1個あたりのコピー数に換算する。スパイク RNA は、5種類の枯草菌遺伝子の mRNA を濃度を公比3で振って混合したカクテル（dose-graded spike cocktail : GSC）として用意した。これにより、各サンプルに細胞1個あたりのコピー数が既知の標準点5点が導入され、これらをつなげば標準直線が得られる。この直線を用いて実際に測定した mRNA の発現値（マイクロアレイの場合、数万種）をコピー数に換算する¹¹⁻¹³⁾（図①参照）。

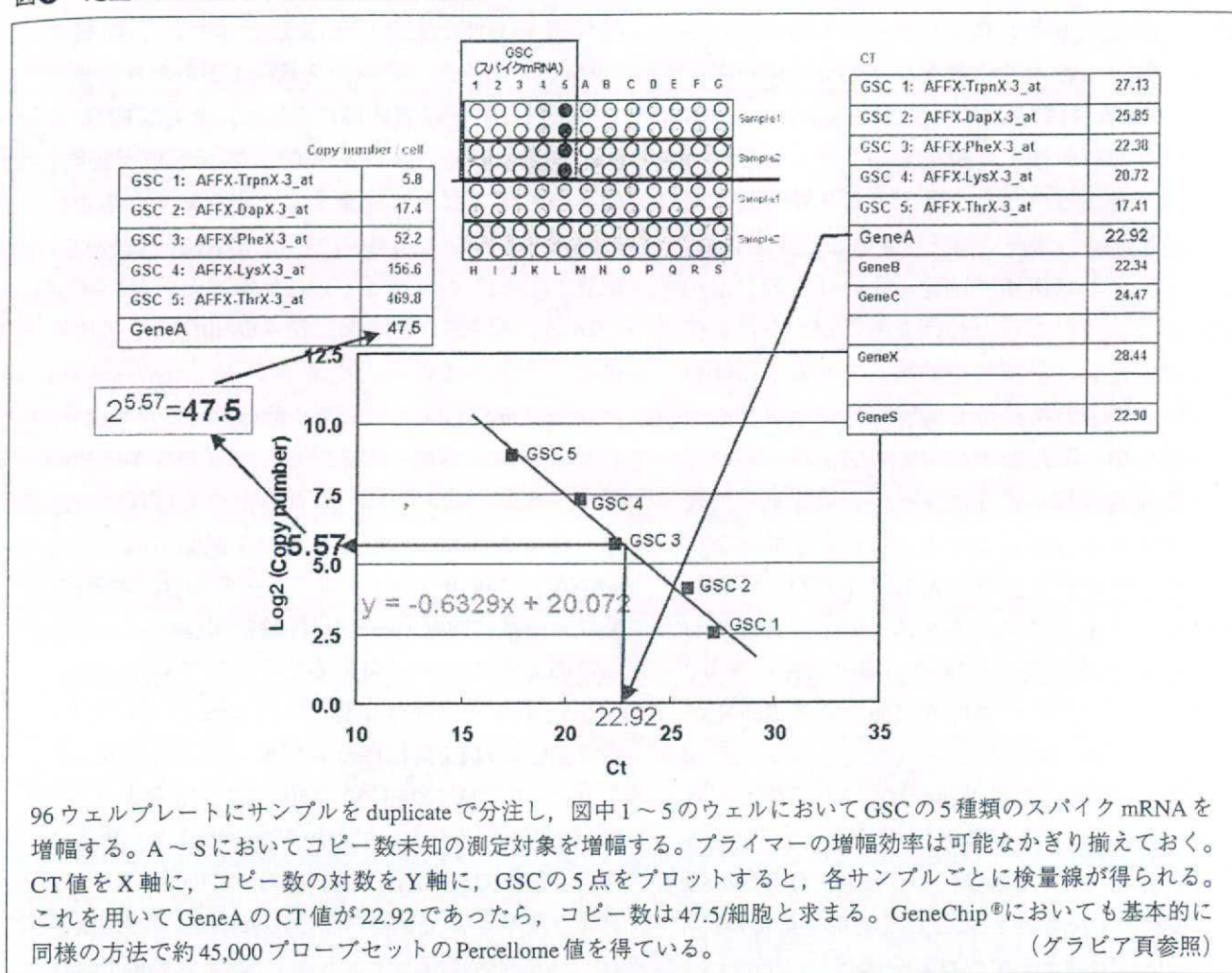
このような測定に用いるマイクロアレイには十分な定量性・直線性が備わっている必要がある。その検証には LBM 標準サンプル〔肝（L）と脳（B）を 100 : 0, 75 : 25, 50 : 50, 25 : 75 および 0 : 100 に混合した5サンプルからなるセット〕を用いた。現在までに、Affymetrix 社 GeneChip®（マウス、ラット、ヒト、ゼノパス）、Agilent 社の単色 44k アレイ（マウス、ラット、ヒト）、および Codelink 社（マウス、ラット、ヒト）マイクロアレイについて、定量性・直線性を確認し、Percellome 測定が可能な状態となっている。

GSC の添加を正確に行うために高精度を要求される DNA 定量については、手作業プロトコルおよび自動ロボット（PerkinElmer 社 JANUS）のプロトコルを準備した。GSC のストックも含め共同研究ベースで供給可能である（連絡先：kanno@nihs.go.jp）。

III. Percellome 法の定量的リアルタイム PCR (Q-PCR) を含む他のプラットフォームへの適用

Percellome 法は、GSC の受け入れ条件を整えることにより、様々なプラットフォームに適用可能である。その1つとして最も定量性が高いとされるリアルタイム PCR（ABI PRISM 7900 HT・96 ウェルプレート）への適用例を示す（図①）。現行の Q-

図1 定量PCRによるPercellome法の概要



96 ウェルプレートにサンプルを duplicate で分注し、図中 1~5 のウェルにおいて GSC の 5 種類のスパイク mRNA を増幅する。A~S においてコピー数未知の測定対象を増幅する。プライマーの増幅効率は可能なかぎり揃えておく。CT 値を X 軸に、コピー数の対数を Y 軸に、GSC の 5 点をプロットすると、各サンプルごとに検量線が得られる。これを用いて GeneA の CT 値が 22.92 であつたら、コピー数は 47.5/細胞と求まる。GeneChip® においても基本的に同様の方法で約 45,000 プローブセットの Percellome 値を得ている。(グラビア頁参照)

PCR 絶対定量法では、遺伝子ごとに検量線が必要であり、多数のサンプルについて多数の遺伝子の発現を定量するには不向きである。Percellome Q-PCR では、マイクロアレイと同様の原理を用いる。すなわち、サンプル破碎液にその細胞数に比例する量の GSC を添加する。それらの Ct 値は既知コピー数に対応することを利用して PCR プレートごとの検量線を得て、それを参照することで測定したい遺伝子の Ct 値を細胞 1 個あたりの mRNA コピー数に換算する。これにより、GAPDH や Actin などのハウスキーピング遺伝子の変動してしまう際の問題、少数の遺伝子を検討する際に Global normalization 法が適応しにくい問題などが解決される。同一サンプルをこの Percellome Q-PCR と Affymetrix GeneChip® とで測定し比較したところ、測定したプローブセットの 9 割程度に整合性が確認され、

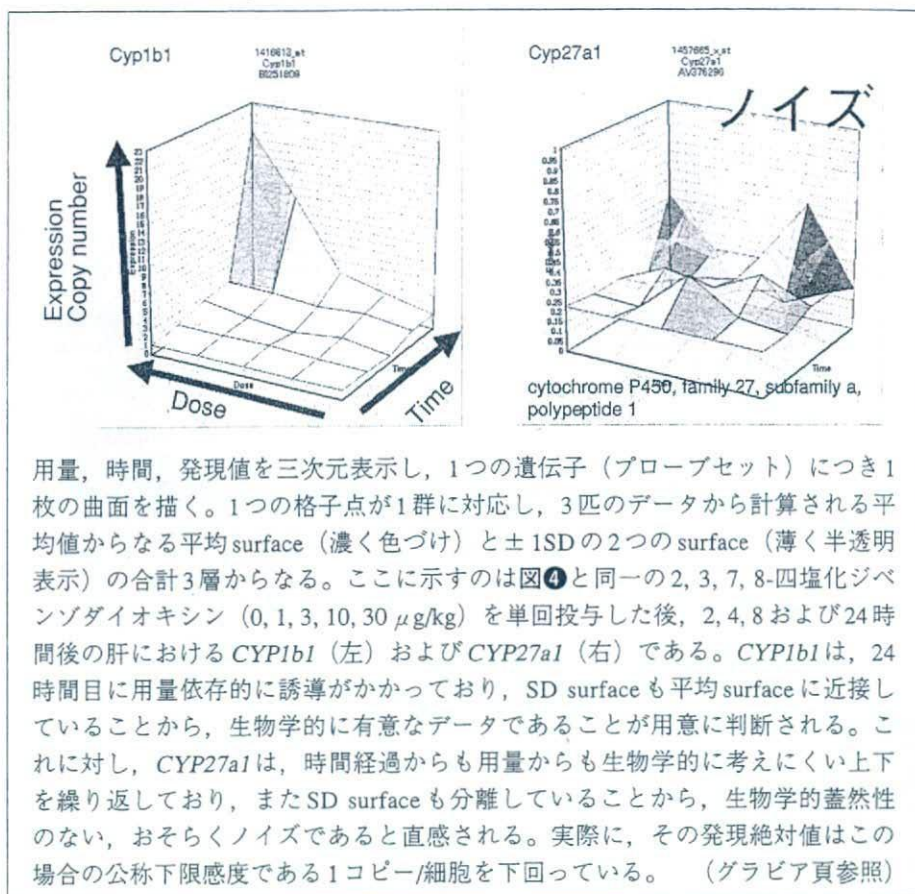
GeneChip® と Percellome Q-PCR との間でのコピー数の換算式が得られている。この他に、Agilent 社製の単色マイクロアレイと CodeLink アレイに GSC を測定可能なカスタムアレイを用意し終え、LBM サンプルのデータなどをもとに、これらとの間の換算式も得つつある。なお、Percellome 法は、Affymetrix 社の新しいエクソンアレイの定量性・直線性の検討にも適応可能である。Affymetrix 社の Human Exon 1.0 ST Array と従来型の発現アレイ Human Genome U133 plus 2 について、性質の異なるヒト癌細胞株 2 株から調製した LBM 様標準サンプル (100 : 0, 75 : 25, 50 : 50, 25 : 75 および 0 : 100 混合 5 サンプル) による比較を行っている。

IV. Percellome Projectの実験 プロトコル

体内に侵入してきた化学物質などを第一に感知するのは、多くの場合タンパク質であり、それからの次の影響が遺伝子発現に波及した場合に mRNA の変動として現れ、それが次のタンパク質を誘導し、次の mRNA 変動を招く、と模式的には考えられる。このような初期応答を観測する目的から、まず成獣の肝を対象とした単回経口投与実験プロジェクトを開始した。mRNA 合成のスピードと動物実験の手技上の現実的限界を考慮

し、単回強制経口投与の 2, 4, 8 および 24 時間後にサンプリングを行うプロトコルを設定した。また、用量依存性を考慮し、投与量を溶媒対象 (0), $\times 1$, $\times \sqrt{10}$, および $\times 10$ とした 4 群を設定した。すなわち、1 つの化合物について、4 (時点) \times 4 (用量) の 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹とした。マウスはノックアウトマウスを併用する前提から C57BL/6 (SLC) を、週齢は肝の酵素が安定する 12 週齢、性別は性周期のない雄とした。また後述するが、肝、腎、肺、心、脳など、ほとんどの臓器に明瞭な日内変動が認められるため、マウスを 10 週齢時点で搬入し、明暗 12 時間サイクルを厳守した環境で 2 週間馴化した後、明サイクル 2 時間目に投与、以後、各予定時刻の前後 20~30 分以内にサンプリングを完了することとした。1 匹につき、麻酔 (エーテル)、脱血 (腋窩動脈より) の後の 2~3 分以内としている (実施要領を執筆中)。マイクロアレイは Affymetrix 社 GeneChip® Mouse430 2.0 (初期は 430A) を用いた。サンプル

図② Percellome Project におけるデータの三次元表示 (Millefeuille surface data)



用量、時間、発現値を三次元表示し、1つの遺伝子 (プローブセット) につき1枚の曲面を描く。1つの格子点が1群に対応し、3匹のデータから計算される平均値からなる平均 surface (濃く色づけ) と $\pm 1SD$ の2つの surface (薄く半透明表示) の合計3層からなる。ここに示すのは図①と同一の 2, 3, 7, 8-四塩化ベンゾダイオキシン (0, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を単回投与した後、2, 4, 8 および 24 時間後の肝における CYP1b1 (左) および CYP27a1 (右) である。CYP1b1 は、24 時間目に用量依存的に誘導がかかっており、SD surface も平均 surface に近接していることから、生物学的に有意なデータであることが用意に判断される。これに対し、CYP27a1 は、時間経過からも用量からも生物学的に考えにくい上下を繰り返しており、また SD surface も分離していることから、生物学的蓋然性のない、おそらくノイズであると直感される。実際に、その発現絶対値はこの場合の公称下限感度である 1 コピー/細胞を下回っている。(グラビア頁参照)

はプールせず、個体ごとに測定した。

V. Percellome Project データの構造 (Millefeuille surface data) と解析

化学物質単回投与による遺伝子発現変動は、時間および用量に依存するという考えから、x 軸 = 時間、y 軸 = 用量、z 軸 = mRNA コピー数とする三次元グラフ上に曲面 (surface) として投与が誘発する遺伝子発現変動を可視化した (図②)。1 つの遺伝子 (GeneChip® ではプローブセット) につき、3 匹の平均 surface と ± 1 標準偏差 (SD) surface を表示することで、視覚的に反応を捉えると同時に、ノイズあるいは artifact であるか否かの感触を容易に得られるようにした。Percellome Project ではこの三次元 surface のパターンを基礎に遺伝子発現カスケードの描出に関わる方法論の開発を進めている (図③)。現在、1 つの実験から得られる GeneChip® 48 枚のデータを一括処理する能力をもった Percellome 自動換算・データ品質管理 (QC) ソフトウェア、